



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/52, 9/12, 1/19, C12P 13/08</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/63388</p> <p>(43) 国際公開日 2000年10月26日 (26.10.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02456</p> <p>(22) 国際出願日 2000年4月14日 (14.04.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/110437 1999年4月19日 (19.04.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 横井治彦(YOKOI, Haruhiko)[JP/JP] 大西淳子(OHNISHI, Junko)[JP/JP] 落合恵子(OCHIAI, Keiko)[JP/JP] 米谷良之(YONETANI, Yoshiyuki)[JP/JP] 〒194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo, (JP) 尾崎明夫(OZAKI, Akio)[JP/JP] 〒747-8522 山口県防府市協和町1番1号 協和醗酵工業株式会社 技術研究所内 Yamaguchi, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。</p>
<p>(54)Title: NOVEL DESENSITIZED ASPARTOKINASE</p> <p>(54)発明の名称 新規な脱感作型アスパルトキナーゼ</p> <p>(57) Abstract A novel aspartokinase originating in a coryneform bacterium; a DNA encoding this enzyme; a recombinant DNA containing the above DNA; a coryneform bacterium having the above recombinant DNA or a coryneform bacterium having the DNA on its chromosome; and a process for producing L-lysine by culturing the above microorganism. Construction has been successfully made of a DNA encoding an aspartokinase with the relief of the synergistic feedback inhibition by L-lysine and L-threonine which originates in a corynebacterium and has a base sequence wherein the amino acid residue at the 311-position in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:18 is an amino acid other than Thr.</p>		

(57)要約

本願発明はコリネ型細菌由来の新規なアスパルトキナーゼ、該酵素をコードするDNA、該DNAを含有する組換え体DNA、該組換え体DNAを保有するコリネ型細菌、あるいは該DNAを染色体上に保有するコリネ型細菌、および該微生物を培養することを特徴とするL-リジンの製造法に関する。

コリネバクテリウム属細菌由来であり、配列番号18記載のアミノ酸配列の311番目のアミノ酸残基がThr以外のアミノ酸である塩基配列を有する、L-リジンおよびL-スレオニンによる協奏的なフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼをコードするDNAを造成することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ベトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

新規な脱感作型アスパルトキナーゼ

技術分野

本願発明はコリネ型細菌由来の新規なアスパルトキナーゼ、該酵素をコードするDNA、該DNAを含有する組換え体DNA、該組換え体DNAを保有するコリネ型細菌、あるいは該DNAを染色体上に保有するコリネ型細菌、および該微生物を培養することを特徴とするL-リジンの製造法に関する。

背景技術

コリネバクテリウム属に属する微生物を用いた発酵法によるL-リジンの製造法としては以下の方法が知られている。

(1) L-リジン生産変異株を用いる方法としては、例えば、S-(2-アミノエチル)-システイン(以下、AECと略す)耐性変異株(アミノ酸発酵、1986年、273頁、学会出版センター)、L-ホモセリン要求変異株(アミノ酸発酵、1986年、273頁、学会出版センター)、呼吸系阻害剤耐性変異株(特公平5-55114)、ピリミジンアナログ耐性変異株(特開昭59-88094)、プリンアナログ耐性変異株(特公昭63-062199)等が知られている。

(2) 遺伝子組換え技術を用いた組換え菌による方法としては、コリネバクテリウム属に属する微生物において、自立複製し、選択可能な表現型を与えるマーカー遺伝子を有するベクタープラスミド、およびそれを効率良く該細菌に導入する方法が開示されており、それらを用いてL-リジンを含む各種L-アミノ酸の合成に関与する遺伝子の細胞内コピー数を増し、該アミノ酸を効率良く製造する方法が開示されている(特公平5-11959、特公平7-55155)。

L-リジンの生合成制御としては、L-アスパラギン酸からアスパラチルリン酸の生合成を触媒するアスパルトキナーゼ(以下、AKと略す)に対するL-リジンとL-スレオニンによる協奏的フィードバック阻害が最も良く知られている。このフィードバック阻害が解除された変異型AK(以下、脱感作型AKと略す)をコ

ードする遺伝子（以下、脱感作型AK遺伝子と略す）を有するコリネバクテリウム属に属する微生物ではLーリジンを菌体外に分泌することが知られている（アミノ酸発酵、1986年、273頁、学会出版センター）。変異の塩基配列情報があれば、試験管内で塩基配列を望みのものに変換する技法（例えば、ストラタジーン社QuikChangeサイトダイレクテッド・ミュータジェネシス・キットを用いる方法）と組み合わせ、野生型遺伝子を変異型に変換しうる。最近、上記脱感作型AK遺伝子の塩基配列レベルの解析が報告されている [Journal of Bacteriology, 175, 4096 (1993); Molecular Microbiology 5, 1197 (1991); 特開平6-62866]。

発明の開示

本願発明の課題は、コリネ型細菌におけるLーリジン生合成の鍵酵素であるAKをLーリジンおよびLースレオニンによる協奏フィードバック阻害およびリジン単独によるフィードバック阻害から解除された脱感作型に改変し、Lーリジンの生産に有利なものにすることである。

本願発明者らは、コリネ型細菌による効率的なLーリジンの生産法に関して鋭意研究した結果、LーリジンおよびLースレオニンによる協奏フィードバック阻害の解除された性質にさらにLーリジン単独でもフィードバック阻害が解除された脱感作型のAKを有する菌株が優れたLーリジン生産能を有することを見出し、本願発明を完成させた。

即ち、本願発明は以下（１）から（１２）に関する。

（１） コリネ型細菌由来であり、配列番号１８記載のアミノ酸配列において３１１番目のアミノ酸残基がThr以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有し、かつLーリジンおよびLースレオニンによる協奏的なフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼをコードするDNA。

（２） DNAが、配列番号１７記載の塩基配列を有するDNAである、上記（１）のDNA。

（３） コリネ型細菌が、コリネバクテリウム属およびブレヒバクテリウム属か

らなる群より選ばれる属に属するコリネ型細菌である、上記（１）のDNA。

（４） 上記（１）～（３）いずれか１つのDNAをベクターに組み込んで得られる、コリネ型細菌で複製可能な組換え体DNA。

（５） 上記（１）～（３）いずれか１つのDNAを染色体上に有する、コリネ型細菌。

（６） 上記（４）の組換え体DNAを保有する、コリネ型細菌に属する形質転換株。

（７） 形質転換株が、コリネバクテリウム・グルタミカムTf-5(FERM BP-6689)である、上記（６）の形質転換株。

（８） 上記（５）のコリネ型細菌、上記（６）および（７）の形質転換株から選ばれる微生物または形質転換株を培地に培養し、培養物中にＬーリジンを生成蓄積させ、該培養物からＬーリジンを採取することを特徴とする、Ｌーリジンの製造法。

（９） 上記（１）～（３）いずれか１つのDNAにコードされるアスパルトキナーゼ。

（１０） コリネ型細菌由来であり、配列番号１８記載のアミノ酸配列の３１番目のアミノ酸残基がThrである塩基配列を有する、アスパルトキナーゼをコードするDNA。

（１１） 配列番号１７記載の９３２番目の塩基がシトシンに置換された塩基配列を有する上記（１０）のDNA。

該DNAを用いることにより、上記（１）のアスパルトキナーゼをコードするDNAを作製することができる。

（１２） 上記（１０）または（１１）のDNAによりコードされるアスパルトキナーゼ。

以下、本願発明について詳細に説明する。

A Kをコードする遺伝子（以下、A K遺伝子と略す）を含むDNAの供給菌としては、コリネ型細菌に属し、A K活性を有する微生物であればいかなる微生物でも良

い。

本願発明におけるコリネ型細菌としてはアグロコッカス(Agrococcus)属、アグロマイセス(Agromyces)属、アースロバクター(Arthrobacter)属、オーレオバクテリウム(Aureobacterium)属、ブレビバクテリウム(Brevibacterium)属、セルロモナス(Cellulomonas)属、クラビバクター(Clavibacter)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、ミクロバクテリウム(Microbacterium)属、ラサイバクター(Rathayibacter)属、テラバクター(Terrabacter)属、ツリセラ(Turicella)属に属する細菌があげられる。好適には、コリネバクテリウム属、ブレビバクテリウム属に属する細菌をあげることができる。具体例として、例えば下記の菌株が用いられる。

コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13032 コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13869 コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13870 コリネバクテリウム・カルナエATCC15991 コリネバクテリウム・アセトグルタミカムATCC15806。

野生型株からはL-リジン、あるいはL-リジンとL-スレオニンによるフィードバック阻害のかかる、野生型のA K遺伝子が供給される。該野生型のA K遺伝子よりフィードバック阻害の解除された脱感作型A K遺伝子を取得する方法としては、例えば、野生型株から変異操作[例えばN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) を用いる方法；微生物実験マニュアル、1986年、131頁、講談社サイエンスフィック社]を施した後、AEC耐性を指標に選択され、L-リジン生産性となった変異株から取得する方法をあげることができる。好適な変異株としては、コリネバクテリウム・グルタミカム野生型株ATCC13032より変異処理により誘導されたL-リジン生産菌、あるいは野生型A K遺伝子を取得した後、上記NTG法あるいは試験管内変異法[例えばヒドロキシルアミンを用いる方法；Molecular and General Genetics, 145, 101 (1978)]によって該遺伝子に変異を誘起し、AEC耐性かつL-リジン生産性を指標に脱感作した脱感作型A K遺伝子を含む株等をあげることができる。

A K遺伝子は、A K遺伝子を含む株より、例えば斎藤らの方法[Biochimica et

Biophysica Acta, 72, 619 (1963)] により単離することで取得することができる。即ち、染色体DNAを調製し、これを適当な制限酵素で切断する。切断後、得られた切断断片を微生物内で自立複製可能なベクター（例えばプラスミド）に連結し、これをAK活性が欠損した宿主微生物に導入する。該微生物よりAK活性を発現するようになった形質転換株を単離し、該形質転換株より該遺伝子を単離することにより取得することができる。

該宿主微生物としては、コリネ型細菌のAK遺伝子が発現可能な微生物であれば、いずれも用いることができる。好適には大腸菌のAK欠損株があげられる。

自立複製可能なベクターとしては、該ベクターを導入した微生物中で自立複製できるものならばいかなるものでも良い。例えば、pUC18（宝酒造社製）、pBluescriptSK(-)（東洋紡社製）等の大腸菌中で自立複製可能なベクター、pCE54（特開昭58-105999）等の大腸菌とコリネ型細菌の両方で自立複製可能なシャトルベクター等をあげることができる。

ベクターとAK遺伝子を含むDNA断片との連結は、T4DNAリガーゼ等を用いる通常の方法で行なうことができる。

宿主への導入は例えば大腸菌の場合、ハナハンらの方法 [Journal of Molecular Biology, 166, 557 (1983)] 等により行なうことができる。

さらに、以下の方法によりAK遺伝子を単離取得できる。

既に公知のコリネバクテリウム・グルタミカム由来AK遺伝子の塩基配列情報 [例えば、ジェンバンク (GenBank) アクセッション・ナンバーE06825] を基にオリゴマーDNAを合成し、該DNAをプライマーとして用い、PCR法により該遺伝子を含むDNA断片を増幅単離する。該DNA断片を選択マーカー遺伝子を有するベクターに連結して大腸菌、コリネ型細菌等の適当な宿主微生物に導入する。該微生物より導入したベクターを単離することにより、AK遺伝子を取得することができる。宿主微生物にAK欠損株を用いる必要はない。

本願発明でいう「コリネ型細菌で複製可能な組換え体DNA」作製のために用いられるベクターとしては、コリネ型細菌中で自立複製しうるものであればいかなるも

のでも良い。具体的には、pCG1 (特開昭57-134500)、pCG2 (特開昭58-35197)、pCG4 (特開昭57-183799)、pCG11 (特開昭57-134500)、pCG116、pCE54、pCB101 (いずれも特開昭58-105999)、pCE51、pCE52、pCE53 [Molecular and General Genetics, 196, 175 (1984)]、および本願発明において作製過程を示したpCS299P等があげられる。好適にはpCG116、pCS299Pなどのようにサイズが比較的小さく、クローニング部位を多数有し、薬剤耐性遺伝子などの選択可能なマーカー遺伝子を持つものが用いられる。

上記組換え体DNAをコリネ型細菌へ導入するための方法として、プロトプラスト法(例えば、特開昭57-186492および特開昭57-18649)、電気穿孔法[例えば、Journal of Bacteriology, 175, 4096 (1993)]等をあげることができる。

本願発明の新規AKをコードするDNAを染色体上に有するコリネ型細菌とは、該AK遺伝子を染色体上に含むコリネ型細菌であればいかなるものでも良い。例えば、変異操作によって取得された株、相同組換え法[Bio/Technology, 9, 84 (1991)]、ファージやトランスポゾンを用いる方法[Escherichia coli and Salmonella typhimurium、1996年、2325頁、2339頁、アメリカン・ソサエティー・フォー・マイクロバイオロジー刊]等により該DNA断片を染色体内に人為的に挿入した微生物等をあげることができる。

以上のようにして取得した、新規AK遺伝子を含むDNAを有するコリネ型細菌に属する形質転換株を培養することにより、培養液中にL-リジンを生成蓄積させることができる。

培養培地としては、炭素源、窒素源、無機塩類などを含む通常の栄養培地を用いることができる。

炭素源としては、例えばグルコース、果糖、シュクロース、マルトース、でんぷん加水分解物等の糖類、エタノールなどのアルコール類、酢酸、乳酸、コハク酸等の有機酸類を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなどの各種無機および有機アンモニウム塩類、尿素、

その他窒素含有化合物、ならびに肉エキス、酵母エキス、コーン・スティーブ・リカー、大豆加水分解物等の窒素含有有機物を用いることができる。

無機塩としてはリン酸第一水素カリウム、リン酸第二水素カリウム、硫酸アンモニウム、塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム等を用いることができる。

その他、必要に応じて、ビオチン、チアミン等の微量栄養源を加えることができる。これら微量栄養源は、肉エキス、酵母エキス、コーン・スティーブ・リカー、カザミノ酸等の培地添加物で代用することもできる。

培養は、振とう培養、深部通気攪拌培養等の好气的条件下で行う。培養温度は一般に20～40℃が好適である。培地中のpHは、中性付近に維持することが好ましい。pHの調整は、無機あるいは有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。培養期間は通常1～6日間である。

培養終了後、菌体を除去する。得られた培養液より活性炭処理、イオン交換樹脂処理などの公知の方法によりL-リジンを回収することができる。

以下に本願発明の実施例を示すが、本願発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

図面の簡単な説明

第1図 第1図はpCS299Pの造成過程を示した図である。

発明を実施するための最良の形態

実施例1 プラスミドpCS299Pの造成

大腸菌とコリネ型細菌双方で自立複製可能なシャトルプラスミドpCS299Pを以下の方法で作製した。

pCG116 [Bio/Technology, 11, 921 (1993)] をBglII (宝酒造社製) で切断し、BglII切断断片を取得した。

pHSG299 (宝酒造社製) をBamHI (宝酒造社製) で切断後、得られたBamHI切断断

片を常法にしたがってエタノール沈殿法により濃縮し、該断片をアルカリフォスファターゼで処理した。得られた上記2種類の断片を混合し、ライゲーションキット ver. 1 (宝酒造社製) を用い、リガーゼ反応を行った。反応産物を用い、常法 [Molecular Cloning, 第2版、1989年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)] に従って大腸菌NM522株を形質転換した。該菌株を、20 μ g/mlのカナマイシンを含むLB寒天培地 [バクトトリプトン (ディフコ社製) 10g、酵母エキス (ディフコ社製) 5g、塩化ナトリウム 10g、バクトアガー (ディフコ社製) 16gを水1Lに含み、pH7.0に調整された培地] 上で培養し、形質転換株を選択した。該形質転換株を20 μ g/mlのカナマイシンを含むLB培地を用い終夜培養し、得られた培養液からアルカリSDS法 (モレキュラー・クローニング第2版) によりプラスミドを調製し、pCS116-299Bgl1 DNAを取得した。

該pCS116-299Bgl1の制限酵素切断部位を常法に従って確認した。

pCS116-299Bgl1 DNAを用いて電気穿孔法 [FEMS Microbiology Letters, 65, 299, (1989)] によりコリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC6872を形質転換した。

該菌株を20 μ g/mlのカナマイシンを含むCM寒天培地 [ポリペプトン S (日本製薬社製) 10g、酵母エキス S (日本製薬社製) 5g、エルリッヒ肉エキス (極東製薬工業社製) 10g、塩化ナトリウム 3g、ビオチン30 μ gを水1Lに含み、pH7.2に調整された培地] 上で培養し、形質転換株を選択した。該形質転換株より常法に従ってプラスミドを抽出し、該プラスミドを制限酵素で切断することにより、該プラスミドがpCS116-299Bgl1であることを確認した。

pCS116-299Bgl1 DNAを、PstI (宝酒造社製) およびBamHIで切断した後、エタノール沈殿法により精製した。得られたDNAからクロシーケンシング用デリレーションキット (宝酒造社製) を用いて部分欠失プラスミドを取得した。該プラスミドを用い、常法に従って大腸菌NM522株を形質転換した。該菌株を20 μ g/mlのカナマイシンを含むLB寒天培地上で培養し、形質転換株を選択した。該形質転換株を20 μ g/mlのカナマイシンを含むLB培地を用い終夜培養し、得られた培養液からアルカリSDS

法にてプラスミドを調製した。常法に従って、得られた各プラスミドの制限酵素地図を作成し、部分欠失長の異なるプラスミドを選択した。

選択したプラスミドを用いて、電気穿孔法によりコリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC6872を形質転換した。得られた形質転換株を20 μ g/mlのカナマイシンを含むCM寒天培地上に塗布後、30°Cで2日培養し、カナマイシン耐性コロニーの出現の有無を指標としてコリネバクテリウム・アンモニアゲネス中で自立複製能を有するプラスミドを選択した。

自立複製能を有するプラスミドの中で最も長い欠失領域を有するプラスミドを選択し、このプラスミドをpCS299del6とした。

pCS299del6 DNAを常法に従って形質転換株より調製した後、制限酵素DraIおよびPvuII（いずれも宝酒造社製）を用いて切断した。該切断DNA断片をアガロースゲル電気泳動により分画後、pCG116由来のDNAを有する約2.7kbのDNA断片を分離し、DNA prep（旭硝子社製）を用いて抽出精製した。

pBluescript SK(+)（東洋紡績社製）DNAを、常法に従ってEcoRV（宝酒造社製）で切断した。得られた切断DNA断片をエタノール沈殿法により濃縮後、アルカリフォスファターゼ処理した。該処理DNA断片をアガロースゲル電気泳動により分画後、DNA prepを用いて抽出精製した。

上記2.7kb断片とpBluescript SK(+)断片をライゲーションキットver. 1を用いて連結した後、該連結DNAを用いて、常法に従って大腸菌NM522株を形質転換した。該菌株を100 μ g/mlのアンピシリン、50 μ g/mlのX-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl- β -D-galactoside)、1mmol/lのIPTG (isopropylthio- β -D-galactoside)を含むLB寒天培地上で培養し、形質転換株を選択した。該形質転換株を100 μ g/mlのアンピシリンを含むLB培地を用い終夜培養し、得られた培養液からアルカリSDS法によりプラスミドを調製した。常法に従って、得られた各プラスミドの制限酵素地図を作成した。EcoRI切断によって3.4kbと2kbの断片を生じるプラスミドをpCSSK21とした。

配列番号1、2に示したDNAを合成し、これらのDNAをプライマーとして、pHSG299DNA

を鋳型として、Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）を用い、添付の反応条件に従って、PCR反応を行った。反応産物を常法に従ってエタノール沈殿した後、制限酵素PstIおよびXhoI（宝酒造社製）を用いて切断した。該切断DNA断片をアガロースゲル電気泳動により分画し、得られた約1.3kbのDNA断片をDNA prepを用いて抽出精製した。

配列番号3、4に示したDNAを合成し、これらのDNAをプライマーとして、pHSG299DNAを鋳型として、Taq DNAポリメラーゼを用い、添付の反応条件に従って、PCRを行った。反応産物を常法に従ってエタノール沈殿した後、制限酵素PstIおよびBglIIを用いて切断した。該切断DNA断片をアガロースゲル電気泳動により分画し、得られた約1.3kbのDNA断片をDNA prepを用いて抽出精製した。

上記で取得したプラスミドpCSSK21をSalI（宝酒造社製）およびBamHIを用いて切断した。該切断DNA断片をアガロースゲル電気泳動により分画し、得られた約2.7kbのDNA断片をDNA prepを用いて抽出精製した。抽出精製された上記の3種類のDNA断片を混合した後、ライゲーションキットver. 1を用いて連結した。

該連結DNA断片を用いて常法に従って大腸菌NM522株を形質転換した。該菌株を20 μ g/mlのカナマイシン、50 μ g/mlのX-Gal、1mmol/lのIPTGを含むLB寒天培地上で培養し形質転換株を選択した。

該形質転換株を、20 μ g/mlのカナマイシンを含むLB培地を用い終夜培養し、得られた培養液からアルカリSDS法によりプラスミドを調製した。常法に従って、得られた各プラスミドの制限酵素地図を作成し、第1図に記載された構造を有するプラスミドをpCS299Pとした。

実施例2 L-リジン生産変異株の作出と該株由来AK遺伝子の塩基配列決定
コリネバクテリウム・グルタミカム野生型株（ATCC13032）にNTGによる変異処理（微生物実験マニュアル、1986年、131頁、講談社サイエンティフィック社）を施した後、1mg/ml AECおよび1mg/ml L-スレオニンを含む最少寒天培地〔グルコース5g、リン酸一水素二カリウム0.75g、リン酸二水素一カリウム0.75g、硫酸アンモニ

ウム 1g、硫酸マグネシウム7水和物 0.5g、塩化ナトリウム 0.1g、硫酸第一鉄7水和物 10mg、硫酸マンガン7水和物 8mg、塩酸カルシウム 1mg、チアミン塩酸塩 1mg、ビオチン 0.03mg、寒天（ディフコ社製）16gを水1Lに含み、pH7.2に調整された培地]に塗布し、30°Cで2日培養した。出現したコロニーを単離し、後述実施例5に示す方法でL-リジンの生産試験を行い、生産性が向上したクローンを選定した。

そのうちの一株（AEC11株）および野生型株ATCC13032より、以下のごとくPCR法によりAK遺伝子を増幅し、塩基配列を決定した。

それぞれの株より、斎藤らの方法 [Biochimica et Biophysica Acta, 72, 619 (1963)]により染色体DNAを調製した。コリネバクテリウム・グルタミカムATCC13869株において既知となっているAK遺伝子の塩基配列 [GenBank, アクセッション・ナンバーE06825] を元にして増幅用のDNAプライマーを設計した。該DNAプライマーを配列番号5および6に示した。上記で調製した染色体DNA、DNAプライマー、パーキンエルマー社製サーマルサイクラー（ジーンアンプPCRシステム 9600）、Phyrococcus sp.KOD株由来DNAポリメラーゼ（東洋紡社製）、および添付のバッファーを用い、PCRを行った。PCRは、94°C-30秒、60°C-30秒、74°C-60秒の反応を1サイクルとして30サイクル行った。増幅された約1.5KbのDNAをPCRプロダクト・プレシーケンシング・キット（アマシャム・ファルマシア社製）を用いて精製後、該精製DNAを鋳型としてサイクルシーケンシングを行った。シーケンス反応に用いるDNAプライマーは、上記AK遺伝子塩基配列を元にしてデザインした。該DNAプライマーを配列番号7~16に示した。ABIプリズム・ダイ・ターミネーター・サイクル・シーケンシング・レディー・リアクション・キット（パーキンエルマー社製）を用い、96°C-10秒、50°C-5秒、60°C-4分の反応を1サイクルとして25サイクルシーケンス反応を行い、ABIプリズム377 DNAシーケンシング・システム（パーキンエルマー社製）により塩基配列を決定した。

AEC11株由来の変異型AK遺伝子の塩基配列および対応するオープン・リーディング・フレームのアミノ酸配列を配列番号17および18に示す。配列番号17に示した変異型AK遺伝子の塩基配列において、932番目のチミンが野生型AK遺伝子では

ではシトシンであった。該塩基置換により、野生型AKの311番目のL-スレオニン残基（コドンACC）が、AEC11株由来AK遺伝子ではイソロイシン残基（コドンATC）に置換されていた。コリネバクテリウム・グルタミカムのAK遺伝子の脱感作変異としては、Ala279のAla以外のアミノ酸への変異（特開平6-62866、特開平6-261766）、Gly345Asp [Journal of Bacteriology, 175, 4096 (1993)]、Ser301Tyr [Molecular Microbiology, 5, 1197 (1991)]、Ser301Phe、Thr308Ile（いずれも特開平6-261766）などの報告があるが、本変異はそのいずれにも該当していなかった。

実施例3 変異型AK遺伝子のクローニングとコリネ型細菌への導入

上記変異のL-リジン生産性への影響を以下の方法で評価した。

コリネバクテリウム・グルタミカム野生型株（ATCC13032）およびL-リジン生産菌AEC11株よりPCR法によりAK遺伝子をクローニングした。実施例2と同様の方法で得られたATCC13032株由来またはAEC11株由来AK遺伝子を含む約1.5Kbの遺伝子断片をSalI、BamHI（宝酒造社製）で処理した後、アガロース電気泳動に供し、ゲルより切り出し、ジーン・クリーン・キット（BIO 101社製）により精製した。実施例1で示した、エシェリヒア・コリとコリネ型細菌内双方で自律増殖可能なシャトルベクターpCS299PをSalI、BamHIで切断し、ライゲーションキットver.1（宝酒造社製）を用いて、上記AK遺伝子断片と連結した。該連結産物を用い、エシェリヒア・コリDH5 α 株（東洋紡社製）を添付マニュアルに従って形質転換した後、アンピシリン100 μ g/mlを含むLB寒天培地で生育するコロニーを単離した。これらのコロニーを培養し、実施例1と同じ方法でプラスミドDNAを調製した。実施例2で示した方法により塩基配列決定を行ない、PCR過程での変異を含まないクローンを選定した。該選定により得られたATCC13032株由来AK遺伝子を含むプラスミドの一つをpAK1、AEC11株由来AK遺伝子を含むプラスミドをpAK2と名付けた。

実施例4 コリネバクテリウム・グルタミカムの野生型AKと変異型AKの酵素解

析

コリネバクテリウム・グルタミカム野生型株ATCC13032にプラスミドpAK1、pAK2およびpCS299Pを、電気穿孔法 [FEMS Microbiology Letters, 65, 299 (1989)] により、それぞれ導入した。得られたプラスミドpAK1を保有する株をTf-14、pAK2を保有する株をTf-5、pCS299Pを保有する株をTf-21と命名した。これら形質転換株のAK活性をフォレットティーらの方法により [Journal of Bacteriology, 175, 4096 (1993)] 測定した。

第1表に形質転換株の粗抽出液のAK比活性を示した。

AK遺伝子を含むプラスミドの導入株 (Tf-14およびTf-5) では、ベクター導入株 (Tf-21) に比べ、AK比活性が約6倍に増大することが示された。Tf-5はL-リジンとL-スレオニンによる協奏的阻害が解除されているだけでなく、L-リジンによるフィードバック阻害も大幅に解除されていた。

Tf-5は、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所 (日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号) に平成11年4月2日付けで受託番号: FERM BP-6689 として寄託されている。

第1表

		AK 比 活 性 (nmol Aspartyl-hydroxamate/ mg-protein/ min)					
菌株		L-Lys		L-Thr		L-Lys + L-Thr	
	無添加	1mM	10mM	1mM	10mM	各 1mM	各 10mM
Tf-21	2.8						
Tf-14	17.3	16.5	9.7	23.1	24.3	4.8	1.2
	(100)	(96)	(56)	(133)	(140)	(28)	(7)
Tf-5	16.7	16.7	15	30.9	35.8	18.2	18.4
	(100)	(100)	(89)	(185)	(215)	(109)	(110)

括弧内は無添加時の比活性を100としたときの相対活性値 (%) を示す。

実施例5 コリネバクテリウム・グルタミカムにおける変異型AKのL-リジン生産能への効果

実施例4で作出されたTf-5、Tf-14およびTf-21のL-リジン生産能を培養評価した。

各菌株を、種培地（ショ糖50g、大豆加水分解物30g、尿素3g、ペプトン20g、カザミノ酸20g、肉エキス20g、硫酸マグネシウム7水和物 0.5g、リン酸二水素一カリウム 2g、硫酸アンモニウム 8g、チアミン・塩酸塩 1mg、ビオチン0.1mg、パントテン酸カルシウム10mg、硫酸第一鉄7水和物 10mg、硫酸亜鉛7水和物 1mg、ニコチン酸 20mg及び炭酸カルシウム 10gを水1Lに含む。pH7.2）5mlに植菌し、30℃で16時間振とう培養を行った。

該培養で得られた種培養液1mlを本培養培地（廃糖蜜200g、硫酸アンモニウム45g、尿素1g、リン酸二水素一カリウム 0.5g、硫酸マグネシウム7水和物 0.5g、ビオチン0.3mg及び炭酸カルシウム 30gを水1Lに含む。pH7.0）10mlに植菌し、30℃で72時間振とう培養した。培養終了時のプラスミド保持率を、プラスミドの薬剤耐性マーカーであるカナマイシンの耐性を指標にして測定したところ、いずれもほぼ100%の高い安定性を示した。

培地中に蓄積したL-リジンの定量は、高速液体クロマトグラフィーにより行なった。

結果を第2表に示した。

本願発明の変異型AK遺伝子の導入により、L-リジン生産能が著しく向上することが示された。

第 2 表

菌株	L-リジン生産性 (g/L)
Tf-21	0.1
Tf-14	0.1
Tf-5	8.1

産業上の利用可能性

本願発明により、コリネ型細菌におけるL-リジン生合成の鍵酵素であるAKをL-リジンおよびL-スレオニンによる協奏フィードバック阻害およびリジン単独によるフィードバック阻害から解除された脱感作型に改変し、L-リジンの生産に有利なものにすることができる。

配列表フリーテキスト

配列番号 1 : 人工配列の説明ー合成DNA

配列番号 2 : 人工配列の説明ー合成DNA

配列番号 3 : 人工配列の説明ー合成DNA

配列番号 4 : 人工配列の説明ー合成DNA

配列番号 5 : 人工配列の説明ー合成DNA

配列番号 6 : 人工配列の説明ー合成DNA

配列番号 7 : 人工配列の説明ー合成DNA

配列番号 8 : 人工配列の説明ー合成DNA

配列番号 9 : 人工配列の説明ー合成DNA

配列番号 10 : 人工配列の説明ー合成DNA

配列番号 11 : 人工配列の説明ー合成DNA

配列番号 1 2 : 人工配列の説明－合成DNA

配列番号 1 3 : 人工配列の説明－合成DNA

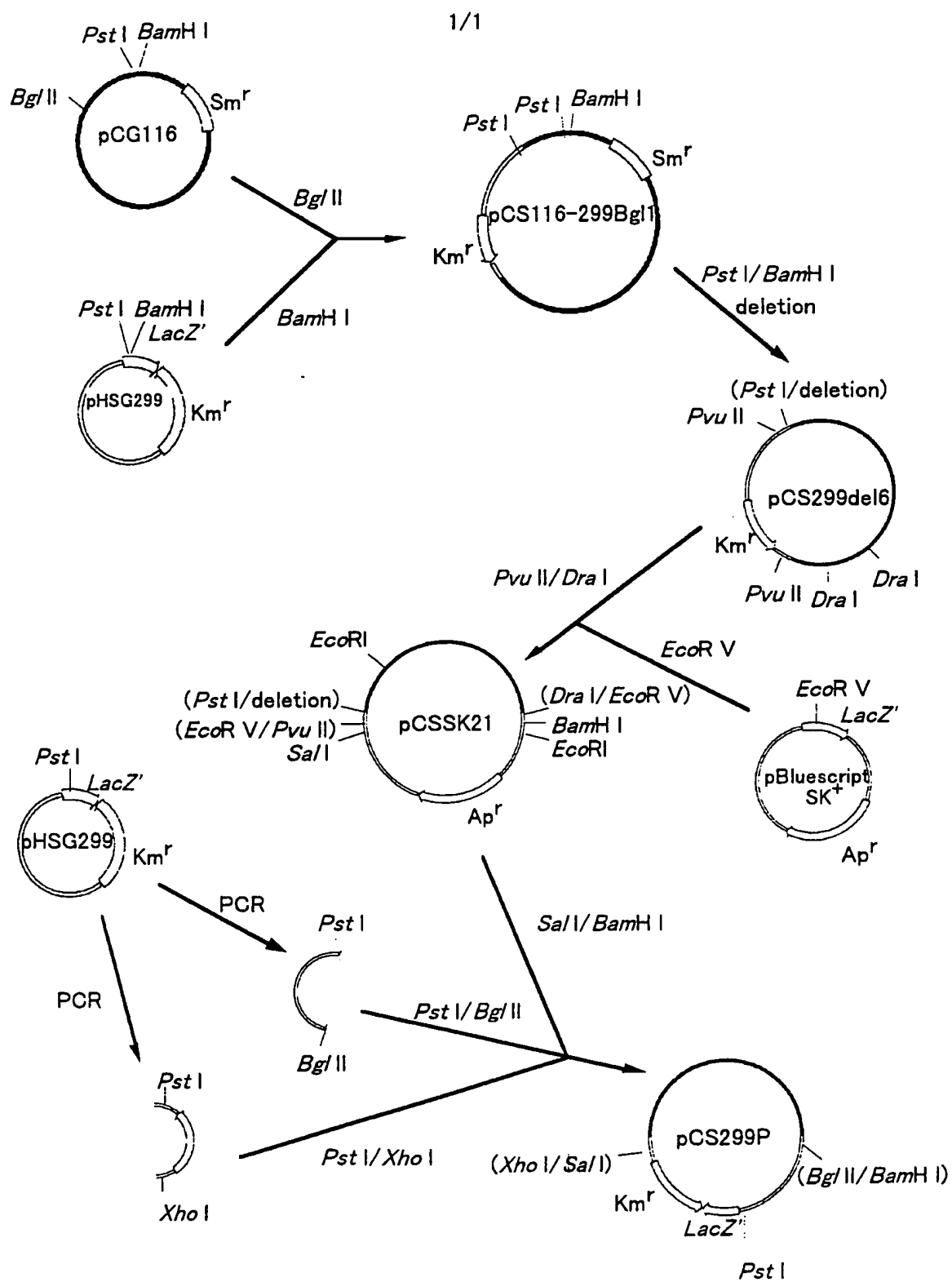
配列番号 1 4 : 人工配列の説明－合成DNA

配列番号 1 5 : 人工配列の説明－合成DNA

配列番号 1 6 : 人工配列の説明－合成DNA

請求の範囲

1. コリネ型細菌由来であり、配列番号 1 8 記載のアミノ酸配列において 3 1 1 番目のアミノ酸残基がThr以外のアミノ酸に置換されたアミノ酸配列を有し、かつL-リジンおよびL-スレオニンによる協奏的なフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼをコードするDNA。
2. DNAが、配列番号 1 7 記載の塩基配列を有するDNAである、請求項 1 記載のDNA。
3. コリネ型細菌が、コリネバクテリウム属およびブレヴィバクテリウム属からなる群より選ばれる属に属するコリネ型細菌である、請求項 1 記載のDNA。
4. 請求項 1 ～ 3 いずれか 1 項に記載のDNAをベクターに組み込んで得られる、コリネ型細菌で複製可能な組換え体DNA。
5. 請求項 1 ～ 3 記載のDNAを染色体上に有するコリネ型細菌。
6. 請求項 4 記載の組換え体DNAを保有する、コリネ型細菌に属する形質転換株。
7. 形質転換株が、コリネバクテリウム・グルタミカムTf-5(FERM BP-6689)である、請求項 6 記載の形質転換株。
8. 請求項 5 記載のコリネ型細菌、請求項 6 および 7 記載の形質転換株から選ばれる微生物または形質転換株を培地に培養し、培養物中にL-リジンを生成蓄積させ、該培養物からL-リジンを採取することを特徴とする、L-リジンの製造法。
9. 請求項 1 ～ 3 いずれか 1 項に記載のDNAにコードされるアスパルトキナーゼ。
10. コリネ型細菌由来であり、配列番号 1 8 記載のアミノ酸配列の 3 1 1 番目のアミノ酸残基がThrである塩基配列を有するアスパルトキナーゼをコードするDNA。
11. アスパルトキナーゼをコードするDNAが、配列番号 1 7 記載の 9 3 2 番目の塩基がシトシンに置換された塩基配列を有する、請求項 1 0 記載のアスパルトキナーゼをコードするDNA。
12. 請求項 9 ～ 1 1 いずれか 1 項に記載のDNAによりコードされるアスパルトキナーゼ。



第1図

配列表
SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> Novel desensitized Aspartate Kinase

<130> 11203W01

<140>

<141>

<150> JP 99/110437

<151> 1999-04-19

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 1

aaaaagatct cgacggatcg ttccactg

28

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 2

gtaaaacgac ggccatg

17

<210> 3
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 3
cgagtcgact cggaagtag cacctgtcac ttttg 35

<210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 4
tggggatccg caccaacaac tgcatgtgtg gtc 33

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 5
aaaactcgag aggtctgcct cgtg 24

<210> 6
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 6

caggaaacag ctatgac

17

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 7

tgcagcggca gtgaatcccg ttccgcc

27

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 8

ttctgacacc actgcagttg cgttgg

26

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 9

tcgcaaccga caagtccgaa gccaaag

27

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 10

tgaagtctca cccaggtgtt accgcagag

29

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 11

caagggactc aatagcgatg gcgacgag

28

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 12

cagcaacttc cagcatttct tcgaagc

27

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 13

gcatcccagt ggctgagacg catccgcta

29

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 14

ctgcgatggt ggtcattgta aaactactcc

30

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 15

catcgcgag agcttccatg aactctgcgg

30

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : Synthetic DNA

<400> 16

gggatcatta ctataagacg agcgtacgcg

30

<210> 17
 <211> 1263
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <221> CDS
 <222>

<400> 17
 gtg gcc ctg gtc gta cag aaa tat ggc ggt tcc tcg ctt gag agt gcg 48
 Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
 1 5 10 15
 gaa cgc att aga aac gtc gct gaa cgg atc gtt gcc acc aag aag gct 96
 Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
 20 25 30
 gga aat gat gtc gtg gtt gtc tgc tcc gca atg gga gac acc acg gat 144
 Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
 35 40 45
 gaa ctt cta gaa ctt gca gcg gca gtg aat ccc gtt ccg cca gct cgt 192
 Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
 50 55 60
 gaa atg gat atg ctc ctg act gct ggt gag cgt att tct aac gct ctc 240
 Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
 65 70 75 80
 gtc gcc atg gct att gag tcc ctt ggc gca gaa gcc caa tct ttc acg 288
 Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
 85 90 95
 ggc tct cag gct ggt gtg ctc acc acc gag cgc cac gga aac gca cgc 336
 Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
 100 105 110
 att gtt gat gtc act cca ggt cgt.gtg cgt gaa gca ctc gat gag ggc 384
 Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
 115 120 125

aag atc tgc att gtt gct ggt ttc cag ggt gtt aat aaa gaa acc cgc	432
Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg	
130 135 140	
gat gtc acc acg ttg ggt cgt ggt ggt tct gac acc act gca gtt gcg	480
Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala	
145 150 155 160	
ttg gca gct gct ttg aac gct gat gtg tgt gag att tac tcg gac gtt	528
Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val	
165 170 175	
gac ggt gtg tat acc gct gac ccg cgc atc gtt cct aat gca cag aag	576
Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys	
180 185 190	
ctg gaa aag ctc agc ttc gaa gaa atg ctg gaa ctt gct gct gtt ggc	624
Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly	
195 200 205	
tcc aag att ttg gtg ctg cgc agt gtt gaa tac gct cgt gca ttc aat	672
Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn	
210 215 220	
gtg cca ctt cgc gta cgc tcg tct tat agt aat gat ccc ggc act ttg	720
Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu	
225 230 235 240	
att gcc ggc tct atg gag gat att cct gtg gaa gaa gca gtc ctt acc	768
Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr	
245 250 255	
ggt gtc gca acc gac aag tcc gaa gcc aaa gta acc gtt ctg ggt att	816
Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile	
260 265 270	
tcc gat aag cca ggc gag gct gcg aag gtt ttc cgt gcg ttg gct gat	864
Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp	
275 280.. 285	
gca gaa atc aac att gac atg gtt ctg cag aac gtc tct tct gta gaa	912

8/10

Ala	Glu	Ile	Asn	Ile	Asp	Met	Val	Leu	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Val	Glu		
290						295					300						
gac	ggc	acc	acc	gac	atc	atc	ttc	acc	tgc	cct	cgt	tcc	gac	ggc	cgc	960	
Asp	Gly	Thr	Thr	Asp	Ile	Ile	Phe	Thr	Cys	Pro	Arg	Ser	Asp	Gly	Arg		
305					310					315					320		
cgc	gcg	atg	gag	atc	ttg	aag	aag	ctt	cag	gtt	cag	ggc	aac	tgg	acc	1008	
Arg	Ala	Met	Glu	Ile	Leu	Lys	Lys	Leu	Gln	Val	Gln	Gly	Asn	Trp	Thr		
				325					330					335			
aat	gtg	ctt	tac	gac	gac	cag	gtc	ggc	aaa	gtc	tcc	ctc	gtg	ggt	gct	1056	
Asn	Val	Leu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Val	Gly	Lys	Val	Ser	Leu	Val	Gly	Ala		
			340					345						350			
ggc	atg	aag	tct	cac	cca	ggt	gtt	acc	gca	gag	ttc	atg	gaa	gct	ctg	1104	
Gly	Met	Lys	Ser	His	Pro	Gly	Val	Thr	Ala	Glu	Phe	Met	Glu	Ala	Leu		
		355					360					365					
cgc	gat	gtc	aac	gtg	aac	atc	gaa	ttg	att	tcc	acc	tct	gag	att	cgt	1152	
Arg	Asp	Val	Asn	Val	Asn	Ile	Glu	Leu	Ile	Ser	Thr	Ser	Glu	Ile	Arg		
		370				375					380						
att	tcc	gtg	ctg	atc	cgt	gaa	gat	gat	ctg	gat	gct	gct	gca	cgt	gca	1200	
Ile	Ser	Val	Leu	Ile	Arg	Glu	Asp	Asp	Leu	Asp	Ala	Ala	Ala	Arg	Ala		
					390					395					400		
ttg	cat	gag	cag	ttc	cag	ctg	ggc	ggc	gaa	gac	gaa	gcc	gtc	gtt	tat	1248	
Leu	His	Glu	Gln	Phe	Gln	Leu	Gly	Gly	Glu	Asp	Glu	Ala	Val	Val	Tyr		
				405				410						415			
gca	ggc	acc	gga	cgc												1263	
Ala	Gly	Thr	Gly	Arg													
				420													

<210> 18

<211> 421

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum.

<400> 18

Val Ala Leu Val Val Gln Lys Tyr Gly Gly Ser Ser Leu Glu Ser Ala
 1 5 10 15

Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Glu Arg Ile Val Ala Thr Lys Lys Ala
 20 25 30

Gly Asn Asp Val Val Val Val Cys Ser Ala Met Gly Asp Thr Thr Asp
 35 40 45

Glu Leu Leu Glu Leu Ala Ala Ala Val Asn Pro Val Pro Pro Ala Arg
 50 55 60

Glu Met Asp Met Leu Leu Thr Ala Gly Glu Arg Ile Ser Asn Ala Leu
 65 70 75 80

Val Ala Met Ala Ile Glu Ser Leu Gly Ala Glu Ala Gln Ser Phe Thr
 85 90 95

Gly Ser Gln Ala Gly Val Leu Thr Thr Glu Arg His Gly Asn Ala Arg
 100 105 110

Ile Val Asp Val Thr Pro Gly Arg Val Arg Glu Ala Leu Asp Glu Gly
 115 120 125

Lys Ile Cys Ile Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asn Lys Glu Thr Arg
 130 135 140

Asp Val Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Ala Val Ala
 145 150 155 160

Leu Ala Ala Ala Leu Asn Ala Asp Val Cys Glu Ile Tyr Ser Asp Val
 165 170 175

Asp Gly Val Tyr Thr Ala Asp Pro Arg Ile Val Pro Asn Ala Gln Lys
 180 185 190

Leu Glu Lys Leu Ser Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ala Val Gly
 195 200 205

Ser Lys Ile Leu Val Leu Arg Ser Val Glu Tyr Ala Arg Ala Phe Asn
 210 215 220

Val Pro Leu Arg Val Arg Ser Ser Tyr Ser Asn Asp Pro Gly Thr Leu
225 230 235 240

Ile Ala Gly Ser Met Glu Asp Ile Pro Val Glu Glu Ala Val Leu Thr
245 250 255

Gly Val Ala Thr Asp Lys Ser Glu Ala Lys Val Thr Val Leu Gly Ile
260 265 270

Ser Asp Lys Pro Gly Glu Ala Ala Lys Val Phe Arg Ala Leu Ala Asp
275 280 285

Ala Glu Ile Asn Ile Asp Met Val Leu Gln Asn Val Ser Ser Val Glu
290 295 300

Asp Gly Thr Thr Asp Ile Ile Phe Thr Cys Pro Arg Ser Asp Gly Arg
305 310 315 320

Arg Ala Met Glu Ile Leu Lys Lys Leu Gln Val Gln Gly Asn Trp Thr
325 330 335

Asn Val Leu Tyr Asp Asp Gln Val Gly Lys Val Ser Leu Val Gly Ala
340 345 350

Gly Met Lys Ser His Pro Gly Val Thr Ala Glu Phe Met Glu Ala Leu
355 360 365

Arg Asp Val Asn Val Asn Ile Glu Leu Ile Ser Thr Ser Glu Ile Arg
370 375 380

Ile Ser Val Leu Ile Arg Glu Asp Asp Leu Asp Ala Ala Ala Arg Ala
385 390 395 400

Leu His Glu Gln Phe Gln Leu Gly Gly Glu Asp Glu Ala Val Val Tyr
405 410 415

Ala Gly Thr Gly Arg
420

PCT/JP 00/02456

REC'D

WIPO

PCT

出願人又は代理人の書類記号

1 2 0 3

国際出願番号

寄託された微生物に関する表示

〔PCT規則13の2〕

A. 以下に示される表示は、明細書中に言及されている微生物に関するものである。

1 3

頁、

1 3

行

B. 寄託の表示

他の寄託が別紙に記載されている ☐

寄託機関の名称

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

寄託機関のあて名（郵便番号及び国名を含む）

日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）

寄託の日付

0 2 . 0 4 . 9 9

受託番号

FERM BP-6689

C. 追加の表示（該当しない場合には記載しない）

この情報は別紙に続いている ☐

ヨーロッパ特許が求められているそれぞれの指定国については、寄託微生物の標本の分譲は欧州特許を付与する旨の告示が公表されるまで、又は欧州特許出願が拒絶され、取下げられ若しくは取下げられたとみなされる日まで標本の請求人により指名された専門家に分譲することによってのみ可能である（Rule 28 (4) EPC）。

D. この表示を行うための指定国（すべての指定国のために行わない場合）

E. 追加事項の表示の提出（該当しない場合には記載しない）

下記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。（例えば「受託番号」のように表示事項を明記する）

— 受理官庁記入欄 —

☐ この用紙は国際出願とともに受理した

権限のある職員

中村 洋也

— 国際事務局記入欄 —

☐ この用紙が国際事務局に受理された日

28 APRIL 2006

権限のある職員

G. H.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02456

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12N15/52, C12N9/12, C12N1/19, C12P13/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12N15/52, C12N9/12, C12N1/19, C12P13/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

DDBJ/GenBank/EMBL/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Kalinowski, J. et al., "Genetic and biochemical analysis of the aspartkinase from Corynebacterium glutamicum", Mol. Microbiol. (1991), Vol.5, No.5, pp.1197-1204	10-12
Y	JP, 6-261766; A (Mitsubishi Petrochemical Co., Ltd.), 20 September, 1994 (20.09.94) (Family: none)	10-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 June, 2000 (27.06.00)Date of mailing of the international search report
04 July, 2000 (04.07.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/52, C12N9/12, C12N1/19, C12P13/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/52, C12N9/12, C12N1/19, C12P13/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)
DDBJ/GenBank/EMBL/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Kalinowski, J. et al. "Genetic and biochemical analysis of the aspartkinase from <i>Corynebacterium glutamicum</i> " Mol. Microbiol. (1991) 第5巻 第5号 p. 1197-1204	10-12
Y	JP, 6-261766, A (三菱油化株式会社) 20.9月. 1994 (20.09.94) (ファミリーなし)	10-12

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27.06.00

国際調査報告の発送日

04.07.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488